

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 09 June 2000 (09.06.00)	
International application No. PCT/JP99/05841	Applicant's or agent's file reference 99-F-051PCT
International filing date (day/month/year) 22 October 1999 (22.10.99)	Priority date (day/month/year) 26 October 1998 (26.10.98)
Applicant IKEDA, Johe et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

22 May 2000 (22.05.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Henrik Nyberg
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

3T

09/830338

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

REC'D 17 NOV 2000

WIPO PCT

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 99-F-051PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/05841	国際出願日 (日.月.年) 22.10.99	優先日 (日.月.年) 26.10.98
国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁷ C12N15/12		
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 22.05.00	国際予備審査報告を作成した日 31.10.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 北村 弘樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9349

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-19

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-19

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-19

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

WO, 97/26331, A (ユニバーシティ オブ オタワ) 24.7月.1997 (24.07.97)
& JP, 11-503620, A

請求の範囲1-19は、文献1(WO, 97/26331, A)より、進歩性を有しない。
文献1には、NAIPのアミノ酸配列が記載されている。また、文献1にはNAIPと特異的に結合する抗体を用いて、該抗体とNAIPとの結合を検出することも記載されている。

文献1に記載されたNAIPのアミノ酸配列のうち、どの領域を認識する抗体を調整するかは、当業者が適宜決定することである。

そして、請求の範囲に記載された領域としたことにより、格別に優れた効果が奏されるとも認められない。

さらに、一次抗体及び二次抗体を使用して抗原蛋白質を検定すること、抗体を固定すること、適当なマーカーを用いることは、いずれも当業者であれば通常になし得ることである。



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 99-F-051PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/05841	国際出願日 (日.月.年) 22.10.99	優先日 (日.月.年) 26.10.98
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/12, C12P 21/08, C07K 16/18,
G01N 33/577, G01N 33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/12, C12P 21/08, C07K 16/18,
G01N 33/577, G01N 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 97/26331, A (ユニバーシティ オブ オタワ) 24.7月.1997 (24.07.97) & JP, 11-503620, A	1-19
A	Biological Abstracts, No.199799598887, Xu D G et al, "Distribution of neuronal apoptosis inhibitory protein-like immunoreactivity in the rat central nervous system", & Journal of Comparative Neurology (1997), Vol.382, No.2, p.247-259	1-19
A	Natalle Roy et al, "The gene for neuronal apoptosis inhibi- tory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy", Cell (1995), Vol.80, No.1, p.167-178	1-19

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.12.99

国際調査報告の発送日

28.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4 N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

129M
BT

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

9 / 8 3 0 3 3 8

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 99-F-051PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/05841	International filing date (day/month/year) 22 October 1999 (22.10.99)	Priority date (day/month/year) 26 October 1998 (26.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 22 May 2000 (22.05.00)	Date of completion of this report 31 October 2000 (31.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05841

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 99/05841

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

WO, 97/26331, A (University of Ottawa), 24 July 1997
(24.07.97) & JP, 11-503620, A

Claims 1-19 do not involve an inventive step in the light of Document 1 (WO, 97/26331, A).

Document 1 discloses the amino acid sequence of NAIP. Document 1 also discloses the use of an antibody which binds specifically with NAIP, and detection of binding of said antibody with NAIP.

Preparation of an antibody which recognizes a region of the amino acid sequence of NAIP disclosed in Document 1 is a routine option open to a person skilled in the art.

Moreover, no surprising advantageous effect is claimed for selecting a region indicated in the claims.

Detection of antigen protein by using a primary antibody and secondary antibody, antibody immobilization and the use of suitable markers are all conventional practices in the art.



(51) 国際特許分類7 C12N 15/12, C12P 21/08, C07K 16/18, G01N 33/577, 33/53	A1	(11) 国際公開番号 WO00/24889 (43) 国際公開日 2000年5月4日(04.05.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05841 (22) 国際出願日 1999年10月22日(22.10.99) (30) 優先権データ 特願平10/304550 1998年10月26日(26.10.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 池田穰衛(IKEDA, Johe)[JP/JP] 〒153-0051 東京都目黒区上目黒5-31-1 Tokyo, (JP) 酒井治美(SAKAI, Harumi)[JP/JP] 〒243-0002 神奈川県厚木市元町1-20 シャトレ・ストンリバー II 207 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 西澤利夫(NISHIZAWA, Toshio) 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 CA, US 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN APOPTOSIS INHIBITORY PROTEIN NAIP AND METHOD FOR ASSAYING NAIP (54) 発明の名称 ヒト・アポトーシス抑制蛋白質NAIPに対するモノクローナル抗体と、NAIPの検定方法 (57) Abstract Monoclonal antibodies specifically recognizing a human apoptosis inhibitory protein NAIP having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 which are anti-NAIP monoclonal antibodies produced respectively by hybridomas prepared by fusing antibody-producing cells of mammals immunized with immunogens containing a polypeptide comprising the amino acid sequence consisting of the amino acids of the numbers 256 to 586 in SEQ ID NO:1 or a polypeptide comprising the amino acid sequence consisting of the amino acids of the numbers 841 to 1052 in SEQ ID NO:1 or parts thereof with a myeloma cell line; a method for assaying NAIP by using these antibodies; and NAIP assay kits.		

この特許出願は、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するヒト・アポトーシス抑制蛋白質 NAIP を特異的に認識するモノクローナル抗体であって、配列番号 1 のアミノ酸番号 256-586 またはアミノ酸番号 841-1052 のアミノ酸配列もしくはそれらの一部配列からなるポリペプチドを含む免疫原によって免疫した哺乳動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞株との融合細胞であるハイブリドーマ細胞群がそれぞれ産生する抗 NAIP モノクローナル抗体と、これらの抗体を用いた NAIP 検定方法、並びに NAIP 検定キットを提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LJ	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

ヒト・アポトーシス抑制蛋白質 NAIP に対するモノクローナル抗体と、 NAIP の検定方法

5

技術分野

この出願は、ヒト・アポトーシス抑制蛋白質 NAIP を特異的に認識するモノクローナル抗体と、この NAIP の免疫検定法に関するものである。

10 背景技術

アポトーシス (apoptosis) は、プログラムされた細胞死の一種であり、周囲の細胞との接触の欠乏、細胞質の濃縮化、エンドヌクレアーゼの活性に関連したクロマチンの凝縮および核凝縮、核の断片化、膜被包性球状小体化、隣接するマクロファージもしくは上皮細胞などによる球状小体の貪食、またはエンドヌクレアーゼ活性により DNA のヌクレオソーム単位が 180~200 塩基長の DNA に断片化するといった現象が観察され、このような現象が認められるアポプティック体細胞の最終断片が隣接する細胞により貪食される機構として論じられている (例えば、Immunology Today 7:115-119, 1986 ; Science 245:301-305, 1989)。

このアポトーシスを制御する遺伝子としてしては、例えば、1985 年に胞性 B 細胞腫から発見されたガン遺伝子のひとつである bcl-2 遺伝子が知られている。この bcl-2 遺伝子は、免疫系や神経性の細胞で高頻度に発現しており、この遺伝子の発現産物はこれら細胞のアポトーシスを抑制することによって、ヒトの免疫機能や神経系機能の恒常性を維持していると考えられている。また、この bcl-2 遺伝子は、胎児では特に広範囲には発現していることから、個体発生の際の形態形成にも重要な役割を果たしていると考えられてもいる。

一方、この出願の発明者等は、家族性の遺伝病である脊髄性筋萎縮症候群 (Spinal Muscular Atrophy : SMA) の原因遺伝子として、ヒト染色体 5q13.1 領域より神経細胞アポトーシス抑制蛋白質 (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein : NAIP) 遺伝子を

単離し (Roy et al., Cell 80: 167-178, 1995)、また特許出願している (PCT/CA95/00581)。すなわち、この NAIP 遺伝子の変異またはコピー数の減少が脊髄ニューロンのアポトーシスを生じさせ、これが SMA 発症の原因となると想定されている。また、この NAIP 遺伝子を種々の培養細胞に導入し、アポトーシスを誘起
5 させる刺激を細胞に与えたところ、その細胞死が抑制されることが明らかにされ (Liston et al., Nature 379:349-353, 1996)、NAIP が神経細胞だけではなく、体細胞全体のアポトーシス抑制因子であることが明らかにされている。

そしてこの出願の発明者等は、NAIP の全アミノ酸配列と NAIP をコードする cDNA を単離し、既に特許出願している (特願平 9-280831 号)。

10 以上のとおり、NAIP は SMA をはじめとする各種アポトーシス性疾患に関与する蛋白質であり、それらの疾患の発症メカニズムの解明、発症の危険性の診断、発症の予防もしくは病態の改善、治療のための医療技術および薬剤の開発等のためには、NAIP 発現量を正確に検定することが不可欠である。

この出願の発明は以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、NAIP の検定
15 に不可欠な抗 NAIP モノクローナル抗体と、このモノクローナル抗体を用いた NAIP 検定方法を提供することを課題としている。

発明の開示

この出願の発明者等は、前記の課題を解決するために検討を重ねた結果、NAIP の
20 抗原領域が、配列番号 1 のアミノ酸番号 256-586 の領域およびアミノ酸番号 841-1052 の領域であることを見出した。

この出願は、この知見に基づき、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するヒト・アポ
トーシス抑制蛋白質 NAIP を特異的に認識するモノクローナル抗体であって、配列番
号 1 のアミノ酸番号 256-586 またはアミノ酸番号 841-1052 のアミノ酸配列もし
25 くはそれらの一部配列からなるポリペプチドを含む免疫原によって免疫した哺乳動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞株との融合細胞であるハイブリドーマ細胞群がそれぞれ産生する抗 NAIP モノクローナル抗体を提供する。

この出願はまた、モノクローナル抗体の具体例として、ハイブリドーマ 656-1 (FERM

BP-6919) が産生するモノクローナル抗体であって、エピトープ領域が配列番号 1 のアミノ酸番号 354-368 の領域であるモノクローナル抗体 hnmc365、ハイブリドーマ 656-2 (FERM BP-6920) が産生するモノクローナル抗体であって、エピトープ領域が配列番号 1 のアミノ酸番号 373-387 の領域であるモノクローナル抗体 hnmc381、
5 およびハイブリドーマ hnmc841 (FERM BP-6921) が産生するモノクローナル抗体であって、エピトープ領域が配列番号 1 のアミノ酸番号 841-1052 の領域であるモノクローナル抗体 hnmc841 を提供する。

またこの出願は、第 1 の NAIP 検定方法として、マーカー標識した前記の抗 NAIP モノクローナル抗体と NAIP を含む試料とを接触させて標識抗体と NAIP を結合させ、
10 この結合体におけるマーカーのシグナル強度を測定することを特徴とする方法を提供する。

この第 1 の検定方法においては、抗 NAIP モノクローナル抗体が、前記のモノクローナル抗体 hnmc365、hnmc381 または hnmc841 であること、マーカーが酵素、放射性同位体または蛍光色素であることを好ましい態様としている。

15 さらにまたこの出願は、第 2 の NAIP 検定方法として、抗 NAIP 一次抗体と NAIP を含む試料とを接触させて一次抗体と NAIP を結合させ、この結合体に抗 NAIP 二次抗体を結合させ、この二次抗体に結合したマーカーのシグナル強度を測定する方法であって、

(1) 一次抗体と二次抗体を請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体とする、

20 (2) 一次抗体を請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体とし、二次抗体を抗 NAIP ポリクローナル抗体とする、または

(3) 一次抗体を抗 NAIP ポリクローナル抗体とし、二次抗体を請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体とする、

ことを特徴とする方法を提供する。

25 この第 2 の検定方法においては、抗 NAIP 一次抗体が固相化されていること、抗 NAIP モノクローナル抗体が前記モノクローナル抗体 hnmc365、hnmc381 および hnmc841 のいずれかであること、およびマーカーが酵素、放射性同位体または蛍光色素であることを好ましい態様としている。

この出願はまた、第 1 の NAIP 検定キットとして、少なくとも以下の要素、

- (a) 抗 NAIP 一次抗体が固相化されたプレート、および
- (b) マーカー標識された抗 NAIP 二次抗体、

からなるキットであって、

- 5 (1) 一次抗体と二次抗体が請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体である、
 - (2) 一次抗体が請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体であり、二次抗体が抗 NAIP ポリクローナル抗体である、または
 - (3) 一次抗体が抗 NAIP ポリクローナル抗体であり、二次抗体が請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体である、
- 10 ことを特徴とする NAIP 検定キットを提供する。

この第 1 の検定キットにおいては、マーカーが放射性同位体または蛍光色素、もしくは酵素であることを好ましい態様としており、マーカーが酵素の場合には、さらに次の要素、

- (c) 酵素活性によって発色する基質

- 15 を有することを好ましい態様としている。

この出願はまたさらに、第 2 の NAIP 検定キットとして、少なくとも以下の要素、

- (a) 抗 NAIP 一次抗体が固相化されたプレート、
- (b) 抗 NAIP 二次抗体、および
- (c) 二次抗体に結合するマーカー、

- 20 からなるキットであって、

- (1) 一次抗体と二次抗体が請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体である、
 - (2) 一次抗体が請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体であり、二次抗体が抗 NAIP ポリクローナル抗体である、または
 - (3) 一次抗体が抗 NAIP ポリクローナル抗体であり、二次抗体が請求項 1 の
- 25 抗 NAIP モノクローナル抗体である、

ことを特徴とする NAIP 検定キットを提供する。

この第 2 の検定キットにおいては、マーカーが放射性同位体または蛍光色素、もしくは酵素であることを好ましい態様としており、マーカーが酵素の場合には、さ

らに次の要素、

(d) 酵素活性によって発色する基質

を有することを好ましい態様としている。

なお、これらの検定キットにおいては、抗 NAIP モノクローナル抗体が、前記モノクローナル抗体 hnmc365、hnmc381 および hnmc841 のいずれかであることを好ましい態様としている。

図面の簡単な説明

第 1 図は、試料溶液中の精製 NAIP 濃度と前記方法により測定した吸光度との関係を示したグラフである。

第 2 図は、ヒト抹消血由来単核球溶解液の抗 NAIP 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果である。レーンは順に、1 : モノクローナル抗体 hnmc365、2 : モノクローナル抗体 hnmc381、3 : モノクローナル抗体 hnmc841、4 : ポリクローナル抗体である。抗体濃度はいずれも 250 倍希釈とした。

発明を実施するための最良の形態

この発明の抗 NAIP モノクローナル抗体は、公知のモノクローナル抗体作成法（「単クローン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990 年；"Monoclonal Antibody" James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996）に従い、例えば以下の様な手順で作製することができる。

1 : ハイブリドーマ細胞群の作製

配列番号 1 のアミノ酸番号 256-586 またはアミノ酸番号 841-1052 もしくはそれらの一部配列からなるポリペプチドを含む免疫原を用いて哺乳動物を免疫し、必要に応じて適宜に追加免疫して動物を十分に感化する。次いでこの動物から抗体産生細胞（リンパ細胞または脾臓細胞）を摘出し、これとミエローマ（骨髓種）細胞株との融合細胞を得る。そして、これらの融合細胞株から、目的とするモノクローナル抗体をそれぞれに産生する複数の細胞を選択し、培養することによって、ハイブリドーマ細胞群を得ることができる。以下、各工程を詳しく説明する。

a) 免疫原の調製

配列番号 1 のアミノ酸番号 265-586 のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、配列番号 2 のヌクレオチド配列を有する NAIPcDNA のヌクレオチド番号 1056-2049 を含む DNA 断片を制限酵素切断等により切り出し、この DNA 断片を適当な宿主ベクター系で発現させることによって調製することができる。また、配列番号 1 のアミノ酸番号 841-1052 のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、配列番号 2 のヌクレオチド番号 2812-3447 の DNA 断片を適当な宿主ベクター系で発現させることにより調製することができる。

あるいは、配列番号 1 のアミノ酸番号 256-586 またはアミノ酸番号 841-1052 領域の一部連続配列（10-20 アミノ酸）からなるポリペプチドを調製してもよい。この場合、配列の異なるポリペプチドを用いることによって、エピトープの異なるモノクローナル抗体をそれぞれに産生するハイブリドーマ細胞群が得られる。

これらのポリペプチドは、他の蛋白質（例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ：GST）との融合蛋白質の形で使用することもできる。このような融合蛋白質の使用は、宿主ベクター系の発現産物からの目的蛋白質の単離、および後記するハイブリドーマ細胞のスクリーニング工程を容易かつ確実とする点において特に好ましい。

なお、ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸番号 256-586 における 1 以上のアミノ酸残基が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するもの、あるいはそのような欠失、置換または付加を有する一部連続配列からなるものであってもよい。

b) 動物の免疫

被免疫動物としては、公知のハイブリドーマ作製法に用いられる哺乳動物を使用することができる。具体的には、たとえばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等である。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点からは、マウスまたはラットを被免疫動物とするのが好ましい。また、実際に使用するマウスおよびラットの系統は特に制限はなく、マウスの場合には、たとえば各系統 A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BR、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、RⅢ、SJL、SWR、WB、129 等が、

またラットの場合には、たとえば、Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer等を用いることができる。このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスでは BALB/c 系統が、ラットでは low 系統が被免疫動物として特に好ましい。なお、これらマウスまたはラットの免疫時の週齢は 5～12 週齢が好まい。

- 5 動物の免疫は、免疫原であるポリペプチド溶液を動物の皮内または腹腔内に投与することによって行うことができる。抗原の投与スケジュールは被免疫動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、抗原投与回数 2～6 回、投与間隔 1～2 週間が好ましい。また、抗原の投与量は動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、10-100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 程度とする。

10 c) 細胞融合

上記の投与スケジュールの最終免疫日から 1～5 日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞またはリンパ細胞を無菌的に取り出す。これらの脾臓細胞またはリンパ細胞からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法に従って行うことができる。

- 次いで、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合する。このミエローマ細胞には
15 特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜に選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立している HGPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 欠損株を用いるのが好ましい。すなわち、マウス由来の X63-Ag8(X63)、NS1-Ag4/1(NS-1)、P3X63-Ag8.U1(P3U1)、X63-Ag8.653(X63.653)、SP2/0-Ag14(SP2/0)、MPC11-
20 45.6TG1.7(45.6TG)、FO、S149/5XXO、BU.1 等、ラット由来の 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3) 等、ヒト由来の U266AR(SKO-007)、GM1500、GTG-A12(GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2(HMy2)、8226AR/NIP4-1(NP41)等である。

- 抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。そのような方法は、
25 例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。

融合細胞と非融合細胞の選択は、例えば、公知の HAT (ヒポキサンチン・アミノ

プテリン・チミジン) 選択法により行うのが好ましい。この方法は、アミノプテリン存在下で生存し得ない HGPRT 欠損株のミエローマ細胞を用いて融合細胞を得る場合に有効である。すなわち、未融合細胞および融合細胞を HAT 培地で培養することにより、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせた融合細胞のみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

d) ハイブリドーマのスクリーニング

目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞のスクリーニングは、公知の酵素免疫検定法 (EIA: Enzyme Immunoassay)、放射線免疫測定法 (RIA: Radio Immunoassay)、蛍光抗体法等により行うことができる。また、融合蛋白質を免疫原とした場合には、融合パートナーである蛋白質について上記の各スクリーニング方法を併せて実施することによって、より確実にハイブリドーマ細胞をスクリーニングすることができる。

このようなスクリーニングによって、エピトープ領域の異なるモノクローナル抗体をそれぞれに産生するハイブリドーマ細胞群が得られる。従って、この発明のモノクローナル抗体は、前記の方法によって作製されたハイブリドーマ細胞群の各々が産生する複数のモノクローナル抗体を全て含むものである。

なお、スクリーニング後のハイブリドーマ細胞は、メチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法によりクローニングし、抗体産生に用いる。

以上の通りの方法によって得たハイブリドーマ細胞は、液体窒素中または -80°C 以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。

2: モノクローナル抗体の取得および精製

上記 1 で作成したハイブリドーマ細胞を公知の方法で培養することによって、NAIP を特異的に認識するモノクローナル抗体を得ることができる。

培養は、例えば、前記のクローニング法で使用した同じ組成の培地中で培養してもよく、あるいはモノクローナル抗体を大量に産生するためには、マウス腹腔内にハイブリドーマ細胞を注射し、腹水からモノクローナル抗体を採取してもよい。

このようにして得たモノクローナル抗体は、例えば硫酸塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等により精

製することができる。

次のこの発明の NAIP 検定方法について説明する。

第 1 の検定方法は、マーカー標識した抗 NAIP モノクローナル抗体 (M-mAb) 溶液と NAIP を含む試料とを接触させて標識モノクローナル抗体と NAIP を結合させ、この結合体 (M-mAb : NAIP) を分離する。分離手段としては、クロマト法、塩析法、アルコール沈殿法、酵素法、固相等の公知の方法を採用することができる。そして、マーカーとして酵素を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から NAIP 量が算出される。マーカーとして放射生同位体を用いる場合には、放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンタ等により測定する。また、マーカーとして蛍光色素を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。

第 2 の検定方法は、NAIP に対するエピトープ領域の異なる 2 種類の抗体 (一次抗体および二次抗体) を用いる。具体的には、先ず、一次抗体 (AbI) と NAIP を含む試料とを接触させて両者を結合させ、この結合体 (AbI : NAIP) にマーカー標識した二次抗体 (M-AbII) を結合させ、この三者の結合体 (AbI : NAIP : M-AbII) におけるマーカーのシグナル強度を測定する。あるいは、さらにシグナルを増強させるためには、非標識の二次抗体を先ず結合体 (AbI : NAIP) に結合させ、この二次抗体にマーカーを結合させるようにしてもよい。このような二次抗体へのマーカー標識分子の結合は、例えば二次抗体をビオチン化し、マーカーをアビジン化しておくことによって行うことができる。あるいは、二次抗体の一部領域 (例えば、Fc 領域) を認識する抗体 (三次抗体) をマーカー標識し、この三次抗体を二次抗体 (II) に結合させるようにしてもよい。なお、一次抗体と二次抗体は、両方ともこの発明の抗 NAIP モノクローナル抗体を用いることもでき、あるいは、一次抗体と二次抗体のいずれか一方を抗 NAIP ポリクローナル抗体 (例えば、前記ポリペプチドで免疫した動物の抗血清) とすることもできる。

この第 2 の方法は、液相系で行うこともでき、または固相系で行うこともできる

が、極微量定量と操作の簡便化のためには、固相系で行うことが好ましい。すなわちこの固相系の方法は、一次抗体を樹脂プレート等に固相化し、この固相化抗体に NAIP を結合させ、非結合 NAIP を洗浄した後、プレート上に残った結合 NAIP に二次抗体を結合させ、この二次抗体のシグナル強度を測定する方法である。この方法は、いわゆる「サンドイッチ法」と呼ばれる方法であり、マーカーとして酵素を用いる場合には、「ELISA (enzyme linked immunospecific assay)」として広く用いられている方法である。

これらの方法においてマーカーとして用いる酵素は、turn over number が大であること、抗体と結合させても安定であること、基質を特異的に着色させる等の条件を満たすものであれば特段の制限はなく、通常の EIA に用いられる酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸化脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることもできる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。これら酵素とモノクローナル抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3,3',5,5'-テトラメチルベンジシンを、また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。

マーカーとして用いる放射性同位体としては、 ^{125}I や ^3H 等の通常の RIA で用いられているものを使用することができる。蛍光色素としては、フルオレッセンスイソチオシアネート (FITC) やテトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC) 等の通常の蛍光抗体法に用いられるものを使用することができる。

この発明の検定キットは、上記第 2 の検定方法を固相系で行うサンドイッチ法のためのキットである。このようなキットは、被検成分の種類に応じて各種のものが市販されており、この発明の検定キットも、抗体として前記抗 NAIP モノクローナル抗体および／または抗 NAIP ポリクローナル抗体を用いることを除き、公知公用のキットに用いられている各要素によって構成することができる。また、前記構成要素

からなるこの発明の検定キットには、非結合 NAIP および／または非結合二次抗体を洗淨するための洗淨液を備えるようにしてもよい。

実施例

- 5 以下、実施例を示してこの発明を詳細かつ具体的に説明するが、この発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例 1 : モノクローナル抗体の作成

(1) 免疫原の調製

- 10 配列番号 2 にヌクレオチド配列を示した NAIPcDNA の 1056-2049 番目領域 (NAIP256-586 領域) を増幅し、この DNA 断片を pGEX-3X (Pharmacia 社製) の制限酵素 EcoR I 部位に挿入した。塩基配列を確認した後、この組換えベクター pGEX-3X (NAIP. 256-586) で宿主大腸菌 BL 21 (DE3) pLysS を形質転換し、LB 培地中で 30°C、5 時間培養し、IPTG を加え、さらに 20°C で 3 時間培養した。菌体を
15 遠心により分離し、溶解溶液 (PBS、Triton X-100) に溶かし、一度 -80°C で凍結させ融解させた後、超音波破碎を行った。1000 x g で 30 分遠心し、上清をグルタチオンセファロース 4B カラムに通液し、GST-NAIP (256-586) 融合蛋白質を得た。

- 20 また、配列番号 2 にヌクレオチド配列を示した NAIPcDNA の 2812-3447 番目領域 (NAIP 841-1052 領域) を増幅し、この DNA 断片を pGEX-4X-3 (Pharmacia 社製) の BamHI-Sall 部位に挿入し、以下、前記方法と同様にして GST-NAIP (841-1052) 融合蛋白質を得た。

(2) 動物の免疫

- 25 前記(1)で得た各々の融合蛋白質 50 μ g/ μ l を Balb/c マウスの腹腔内に投与して初回免疫とした。初回免疫から 2 週間後の 2 回目の免疫を行い、その後は 1 週間間隔で 6 回まで免疫した。なお、融合蛋白質は、初回免疫では等量の Freund 完全アジュバンドと混合して投与し、2 回目から 5 回目まで Freund 不完全アジュバンドと混合して投与した。最終免疫は融合蛋白質溶液のみを投与した。

(3) 細胞融合

最終免疫日の 3 日後に脾臓細胞を無菌的に摘出し、この脾臓細胞とマウスのミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 とを混合し、ポリエチレングリコール#4000 を用いて融合処理した。得られた細胞を 96 穴プレートにまき、HAT 培地により融合細胞を選択した。

5 (4) スクリーニング

免疫原として使用した NAIP ポリペプチドを固相化した ELISA プレートと、GST を固相化した ELISA プレートを作製し、GST プレートには反応せず、NAIP プレートにのみ反応するクローンを選択し、スクリーニングした。次いで、各ハイブリドーマの培養上清のうち、NAIP ポリペプチドに反応するウェルを陽性として、陽性ウェルより限界希釈法を用いてハイブリドーマのクローニングを行い、単一クローンとなったハイブリドーマの培地に対して再度スクリーニングを行い、複数のハイブリドーマ細胞を得た。このうち、ハイブリドーマ 656-1、656-2 および hnmc841 を工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。各々の受託番号は、FERM BP-6919 (ハイブリドーマ 656-1)、FERM BP-6920 (ハイブリドーマ 656-2) および FERM BP-6921 (ハイブリドーマ hnmc841) である。

15 (5) モノクローナル抗体の作成

得られた 3 種類のハイブリドーマ細胞を Balb/c 系マウスの腹腔内にそれぞれ投与し、1 週間後にモノクローナル抗体を含む腹水を採取した。この腹水から、プロテイン G を用いたアファニティーカラムにより 3 種類のモノクローナル抗体 hnmc365、hnmc381 および hnmc841 を精製した。

GST-NAIP (256-586) 融合蛋白質を免疫原として作成されたハイブリドーマ 656-1 から産生されたモノクローナル抗体 hnmc365 はサブクラス IgG1 で、そのエピトープ領域は配列番号 1 のアミノ酸番号 254-368 の領域であり、同じくハイブリドーマ 656-2 から産生されたモノクローナル抗体 hnmc381 はサブクラス IgG2b で、エピトープ領域は配列番号 1 のアミノ酸番号 373-387 の領域であることを確認した。また、GST-NAIP (841-1052) 融合蛋白質を免疫原として作成されたハイブリドーマ hnmc841 から産生されたモノクローナル抗体 hnmc841 はサブクラス IgG1 で、エピトープ領域は配列番号 1 のアミノ酸番号 841-1052 の領域であることを確認した。

実施例 2 : ポリクローナル抗体の作成

- 実施例 1 (1)と同様に調製した GST-NAIP (256-586) 融合蛋白質を免疫原として、
定法によりウサギ (Japanese White Rabbit) を免疫し、抗血清を単離し、上記融合蛋
5 白質を結合したセファロース 4B カラムによってポリクローナル抗体を精製した。

実施例 3 : ELISA キットの作成

(1) 一次抗体固相化プレート

- 150 mmol/l の塩化ナトリウムおよび 1 g/l のアジ化ナトリウムを含む 10 mmol/l
10 のリン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) に、実施例 1 で作成したの抗 NAIP モノクロー
ナル抗体 hnm365 溶液 (20 μ g/ml) を溶解し、この溶液を ELISA 用 96 穴プレートの
各穴に 50 μ l ずつ分注した。4°C で 16 時間保存後、150 mmol/l の塩化ナトリウムを
含む 10 mmol/l のリン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) で洗浄し、抗 NAIP モノクロー
ナル抗体固相化プレートを作成した。

15 (2) ビオチン化二次抗体

- 実施例 2 で作成した抗 NAIP ポリクローナル抗体 10 mg に対し、N, N-ジメチルホ
ルムアミドに溶解したビオチンアミドカプロン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエ
ステルを 0.01 mmol 添加した。25°C で 3 時間保温後、50 mmol/l のリン酸ナトリウム
緩衝液 (pH7.4) 中で 16 時間透析を行い、ビオチン化抗 NAIP ポリクローナル抗体
20 を作成した。

(3) 二次抗体結合マーカー

- 西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液を、150 mmol/l の塩
化ナトリウムおよび 1 g/l のカゼインを含む 10 mmol/l のリン酸カリウム緩衝液
(pH7.2) で 0.5 μ g/ml の濃度に希釈し、マーカー溶液とした。

25

実施例 4 : NAIP 検定

(1) 操作方法

- 精製 NAIP を様々な濃度で含有する試料溶液を、150 mmol/l の塩化ナトリウムを含

む 10 mmol/l リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) で希釈し、実施例 3 (1) の一次抗体固相化プレートの各穴に 50 μ l ずつ分注した。37°C で 1 時間保温後、150 mmol/l 塩化ナトリウムを含む 10 mmol/l リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) で洗浄した。

次に、実施例 3 (2) のビオチン化抗 NAIP ポリクローナル抗体を、150 mmol/l 塩化ナトリウムおよび 1 g/l カゼインを含む 10 mmol/l リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) で 0.5 μ g/ml 濃度に希釈し、前記プレートの各穴に 100 μ l ずつ分注した。37°C で 1 時間保温後、150 mmol/l 塩化ナトリウムを含む 10 mmol/l リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) で洗浄した。

最後に、実施例 3 (3) の西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液を前記プレートの各穴に 100 μ l ずつ分注し、37°C で 1 時間保温後、150 mmol/l 塩化ナトリウムを含む 10 mmol/l リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) で洗浄した。

(2) 発色反応・吸光度測定

3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB) を 50 mmol/l 濃度となるように N, N-ジメチルホルムアミドに溶解し、この溶液を 100 mmol/l 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) で 1/100 に希釈し、ろ紙でろ過した。この溶液 10 ml に 10 g/l の過酸化水素水を 0.1 ml 添加し、発色液とした。この発色液を前記プレートの各穴に 50 μ l ずつ分注し、30°C で 30 分間保温した後、2 mol/l 硫酸を各穴に 50 μ l ずつ分注し、反応を停止させた後、450 nm の吸光度を測定した。

(3) 結果

図 1 は、試料溶液中の精製 NAIP 濃度と前記方法により測定した吸光度との関係を示したグラフである。試料中の NAIP 濃度は測定限界 4 ng/ml から 20 ng/ml の範囲で検定可能であった。

この結果から、例えば図 1 のような測定結果を標準線とすることによって、NAIP 濃度未知の試料についても、その吸光度から NAIP 濃度を正確に検定することが可能であることが確認された。

実施例 5 : ウエスタンブロット

(1) SDS ゲル電気泳動用試料の作成

正常ヒト末梢血 10 ml から Ficoll Paque PLUS (Amasham-Pharmacia 社製) を用いて単核球を単離した。得られた単核球を 5—10%トリクロロ酢酸で固定後、細胞を遠心により分離し、2% Lithium Dodesyl sulfate、8 M urea、1% DTT、1% Triton X-100 を含むトリス緩衝液に溶解した。

5 (2) ウエスタンブロット

上記の試料を用いて SDS ゲル電気泳動を行い、続いて PVDF 膜上に転写した。転写後の PVDF 膜は、10%スキムミルク、0.05% Tween 20 を含む TBS で 4℃一晩処理した後、0.05% Tween 20 を含む TBS (TBST) で洗浄し、各抗体を適宜 TBST で希釈し、室温で 2 時間反応させた。続いて、TBST で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識
10 抗ウサギ Ig 抗体または抗マウス Ig 抗体 (Amasham-Pharmacia 社製) を室温で 1 時間反応させ、TBST で洗浄し、ECL PLUS 試薬 (Amasham-Pharmacia 社製) で処理し、X線フィルムに露光してシグナルを得た。

(3) 結果

結果は第 2 に示したとおりである。モノクローナル抗体を用いたブロットでは、
15 3 種いずれにおいても、抗 NAIP ポリクローナル抗体で得られた 160 kDa のシグナルが検出された。

以上の結果から、実施例 1 で作成したモノクローナル抗体 hnmc365、hnmc381 および hnmc841 は NAIP に対する特異的モノクローナル抗体であり、これらのモノクローナル抗体を用いることによって NAIP の検出が可能であることが確認された。

20

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、生体試料中のヒト・アポトーシス抑制蛋白質 NAIP を簡便かつ高精度で定量化することが可能となる。これによって、各種アポトーシス性疾患の発症メカニズムの解明、発症の危険性の診断、
25 発症の予防もしくは病態の改善、治療のための医療技術および薬剤の開発等が促進される。

請求の範囲

1. 配列番号1のアミノ酸配列を有するヒト・アポトーシス抑制蛋白質 NAIP を特異的に認識するモノクローナル抗体であって、配列番号1のアミノ酸番号 256-586
5 またはアミノ酸番号 841-1052 のアミノ酸配列もしくはそれらの一部配列からなるポリペプチドを含む免疫原によって免疫した哺乳動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞株との融合細胞であるハイブリドーマ細胞群がそれぞれ産生する抗 NAIP モノクローナル抗体。
- 10 2. ハイブリドーマ 656-1 (FERM BP-6919) が産生するモノクローナル抗体であって、エピトープ領域が、配列番号1のアミノ酸番号 354-365 の領域である抗 NAIP モノクローナル抗体 hnmc365。
- 15 3. ハイブリドーマ 656-2 (FERM BP-6920) が産生するモノクローナル抗体であって、エピトープ領域が、配列番号1のアミノ酸番号 373-387 の領域である抗 NAIP モノクローナル抗体 hnmc381。
- 20 4. ハイブリドーマ hnmc841 (FERM BP-6921) が産生するモノクローナル抗体であって、エピトープ領域が、配列番号1のアミノ酸番号 841-1052 の領域である抗 NAIP モノクローナル抗体 hnmc841。
5. マーカー標識した請求項1の抗 NAIP モノクローナル抗体と NAIP を含む試料とを接触させて標識抗体と NAIP を結合させ、この結合体におけるマーカーのシグナル強度を測定することを特徴とする NAIP の検定方法。
- 25 6. 抗 NAIP モノクローナル抗体が、請求項2から4のいずれかのモノクローナル抗体である請求項5の NAIP 検定方法。

7. マーカーが酵素、放射性同位体または蛍光色素である請求項 5 または 6 の NAIP 検定方法。

8. 抗 NAIP 一次抗体と NAIP を含む試料とを接触させて一次抗体と NAIP を結合させ、この結合体に抗 NAIP 二次抗体を結合させ、この二次抗体に結合したマーカーのシグナル強度を測定する方法であって、

(1) 一次抗体と二次抗体を請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体とする、

(2) 一次抗体を請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体とし、二次抗体を抗 NAIP ポリクローナル抗体とする、または

10 (3) 一次抗体を抗 NAIP ポリクローナル抗体とし、二次抗体を請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体とする、
ことを特徴とする NAIP の検定方法。

9. 一次抗体が固相化されている請求項 8 の NAIP 検定方法。

15

10. 抗 NAIP モノクローナル抗体が、請求項 2 から 4 のいずれかのモノクローナル抗体である請求項 8 または 9 の NAIP 検定方法。

11. マーカーが酵素、放射性同位体または蛍光色素である請求項 8、9 または 10
20 の NAIP 検定方法。

12. 少なくとも以下の要素、

(a) 抗 NAIP 一次抗体が固相化されたプレート、および

(b) マーカー標識された抗 NAIP 二次抗体、

25 からなるキットであって、

(1) 一次抗体と二次抗体が請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体である、

(2) 一次抗体が請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体であり、二次抗体が抗 NAIP ポリクローナル抗体である、または

(3) 一次抗体が抗 NAIP ポリクローナル抗体であり、二次抗体が請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体である、
ことを特徴とする NAIP 検定キット。

5 13. 抗 NAIP モノクローナル抗体が、請求項 2 から 4 のいずれかのモノクローナル抗体である請求項 12 の NAIP 検定キット。

14. マーカーが放射性同位体または蛍光色素である請求項 12 または 13 の検定キット。

10

15. マーカーが酵素であり、さらに以下の要素、

(c) 酵素活性によって発色する基質
を有する請求項 12 または 13 の検定キット。

15 16. 少なくとも以下の要素、

(a) 抗 NAIP 一次抗体が固相化されたプレート、

(b) 抗 NAIP 二次抗体、および

(c) 二次抗体に結合するマーカー、
からなるキットであって、

20 (1) 一次抗体と二次抗体が請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体である、

(2) 一次抗体が請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体であり、二次抗体が抗 NAIP ポリクローナル抗体である、または

(3) 一次抗体が抗 NAIP ポリクローナル抗体であり、二次抗体が請求項 1 の抗 NAIP モノクローナル抗体である、

25 ことを特徴とする NAIP 検定キット。

17. 抗 NAIP モノクローナル抗体が、請求項 2 から 4 のいずれかのモノクローナル抗体である請求項 16 の NAIP 検定キット。

18. マーカーが放射性同位体または蛍光色素である請求項 16 または 17 の検定キット。

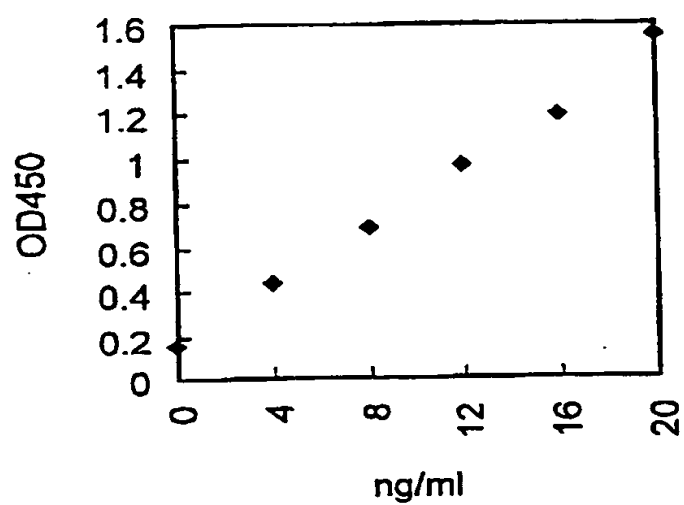
5 19. マーカーが酵素であり、さらに以下の要素、

(d) 酵素活性によって発色する基質
を有する請求項 16 または 17 の検定キット。

1/2

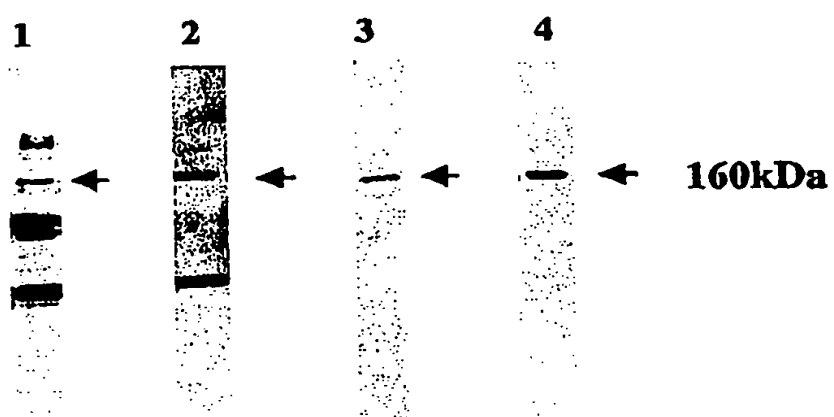
第1図

精製NAIP標準試料検定結果



2/2

第2図



配列表

<110> Japan Science and Technology Corporation,
and Hatumi SAKAI

<120> ヒト・アポトーシス抑制蛋白質 NAIP に対するモノクローナル抗体と、
NAIP 検定方法

<130> 99-F-051PCT/YS

<150> JP No. 10-304550

<151> 1998-10-26

<160> 2

<210> 1

<211> 1403

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Thr Gln Gln Lys Ala Ser Asp Glu Arg Ile Ser Gln Phe Asp

1 5 10 15

His Asn Leu Leu Pro Glu Leu Ser Ala Leu Leu Gly Leu Asp Ala Val

20 25 30

Gln Leu Ala Lys Glu Leu Glu Glu Glu Glu Gln Lys Glu Arg Ala Lys

35 40 45

Met Gln Lys Gly Tyr Asn Ser Gln Met Arg Ser Glu Ala Lys Arg Leu

50 55 60

Lys Thr Phe Val Thr Tyr Glu Pro Tyr Ser Ser Trp Ile Pro Gln Glu

65 70 75 80

Met Ala Ala Ala Gly Phe Tyr Phe Thr Gly Val Lys Ser Gly Ile Gln

85 90 95

Cys Phe Cys Cys Ser Leu Ile Leu Phe Gly Ala Gly Leu Thr Arg Leu

100 105 110

Pro Ile Glu Asp His Lys Arg Phe His Pro Asp Cys Gly Phe Leu Leu
115 120 125

Asn Lys Asp Val Gly Asn Ile Ala Lys Tyr Asp Ile Arg Val Lys Asn
130 135 140

Leu Lys Ser Arg Leu Arg Gly Gly Lys Met Arg Tyr Gln Glu Glu Glu
145 150 155 160

Ala Arg Leu Ala Ser Phe Arg Asn Trp Pro Phe Tyr Val Gln Gly Ile
165 170 175

Ser Pro Cys Val Leu Ser Glu Ala Gly Phe Val Phe Thr Gly Lys Gln
180 185 190

Asp Thr Val Gln Cys Phe Ser Cys Gly Gly Cys Leu Gly Asn Trp Glu
195 200 205

Glu Gly Asp Asp Pro Trp Lys Glu His Ala Lys Trp Phe Pro Lys Cys
210 215 220

Glu Phe Leu Arg Ser Lys Lys Ser Ser Glu Glu Ile Thr Gln Tyr Ile
225 230 235 240

Gln Ser Tyr Lys Gly Phe Val Asp Ile Thr Gly Glu His Phe Val Asn
245 250 255

Ser Trp Val Gln Arg Glu Leu Pro Met Ala Ser Ala Tyr Cys Asn Asp
260 265 270

Ser Ile Phe Ala Tyr Glu Glu Leu Arg Leu Asp Ser Phe Lys Asp Trp
275 280 285

Pro Arg Glu Ser Ala Val Gly Val Ala Ala Leu Ala Lys Ala Gly Leu
290 295 300

Phe Tyr Thr Gly Ile Lys Asp Ile Val Gln Cys Phe Ser Cys Gly Gly
305 310 315 320

Cys Leu Glu Lys Trp Gln Glu Gly Asp Asp Pro Leu Asp Asp His Thr
325 330 335

Arg Cys Phe Pro Asn Cys Pro Phe Leu Gln Asn Met Lys Ser Ser Ala
340 345 350
Glu Val Thr Pro Asp Leu Gln Ser Arg Gly Glu Leu Cys Glu Leu Leu
355 360 365
Glu Thr Thr Ser Glu Ser Asn Leu Glu Asp Ser Ile Ala Val Gly Pro
370 375 380
Ile Val Pro Glu Met Ala Gln Gly Glu Ala Gln Trp Phe Gln Glu Ala
385 390 395 400
Lys Asn Leu Asn Glu Gln Leu Arg Ala Ala Tyr Thr Ser Ala Ser Phe
405 410 415
Arg His Met Ser Leu Leu Asp Ile Ser Ser Asp Leu Ala Thr Asp His
420 425 430
Leu Leu Gly Cys Asp Leu Ser Ile Ala Ser Lys His Ile Ser Lys Pro
435 440 445
Val Gln Glu Pro Leu Val Leu Pro Glu Val Phe Gly Asn Leu Asn Ser
450 455 460
Val Met Cys Val Glu Gly Glu Ala Gly Ser Gly Lys Thr Val Leu Leu
465 470 475 480
Lys Lys Ile Ala Phe Leu Trp Ala Ser Gly Cys Cys Pro Leu Leu Asn
485 490 495
Arg Phe Gln Leu Val Phe Tyr Leu Ser Leu Ser Ser Thr Arg Pro Asp
500 505 510
Glu Gly Leu Ala Ser Ile Ile Cys Asp Gln Leu Leu Glu Lys Glu Gly
515 520 525
Ser Val Thr Glu Met Cys Met Arg Asn Ile Ile Gln Gln Leu Lys Asn
530 535 540
Gln Val Leu Phe Leu Leu Asp Asp Tyr Lys Glu Ile Cys Ser Ile Pro
545 550 555 560

Gln Val Ile Gly Lys Leu Ile Gln Lys Asn His Leu Ser Arg Thr Cys
565 570 575

Leu Leu Ile Ala Val Arg Thr Asn Arg Ala Arg Asp Ile Arg Arg Tyr
580 585 590

Leu Glu Thr Ile Leu Glu Ile Lys Ala Phe Pro Phe Tyr Asn Thr Val
595 600 605

Cys Ile Leu Arg Lys Leu Phe Ser His Asn Met Thr Arg Leu Arg Lys
610 615 620

Phe Met Val Tyr Phe Gly Lys Asn Gln Ser Leu Gln Lys Ile Gln Lys
625 630 635 640

Thr Pro Leu Phe Val Ala Ala Ile Cys Ala His Trp Phe Gln Tyr Pro
645 650 655

Phe Asp Pro Ser Phe Asp Asp Val Ala Val Phe Lys Ser Tyr Met Glu
660 665 670

Arg Leu Ser Leu Arg Asn Lys Ala Thr Ala Glu Ile Leu Lys Ala Thr
675 680 685

Val Ser Ser Cys Gly Glu Leu Ala Leu Lys Gly Phe Phe Ser Cys Cys
690 695 700

Phe Glu Phe Asn Asp Asp Asp Leu Ala Glu Ala Gly Val Asp Glu Asp
705 710 715 720

Glu Asp Leu Thr Met Cys Leu Met Ser Lys Phe Thr Ala Gln Arg Leu
725 730 735

Arg Pro Phe Tyr Arg Phe Leu Ser Pro Ala Phe Gln Glu Phe Leu Ala
740 745 750

Gly Met Arg Leu Ile Glu Leu Leu Asp Ser Asp Arg Gln Glu His Gln
755 760 765

Asp Leu Gly Leu Tyr His Leu Lys Gln Ile Asn Ser Pro Met Met Thr
770 775 780

Val Ser Ala Tyr Asn Asn Phe Leu Asn Tyr Val Ser Ser Leu Pro Ser
785 790 795 800
Thr Lys Ala Gly Pro Lys Ile Val Ser His Leu Leu His Leu Val Asp
805 810 815
Asn Lys Glu Ser Leu Glu Asn Ile Ser Glu Asn Asp Asp Tyr Leu Lys
820 825 830
His Gln Pro Glu Ile Ser Leu Gln Met Gln Leu Leu Arg Gly Leu Trp
835 840 845
Gln Ile Cys Pro Gln Ala Tyr Phe Ser Met Val Ser Glu His Leu Leu
850 855 860
Val Leu Ala Leu Lys Thr Ala Tyr Gln Ser Asn Thr Val Ala Ala Cys
865 870 875 880
Ser Pro Phe Val Leu Gln Phe Leu Gln Gly Arg Thr Leu Thr Leu Gly
885 890 895
Ala Leu Asn Leu Gln Tyr Phe Phe Asp His Pro Glu Ser Leu Ser Leu
900 905 910
Leu Arg Ser Ile His Phe Pro Ile Arg Gly Asn Lys Thr Ser Pro Arg
915 920 925
Ala His Phe Ser Val Leu Glu Thr Cys Phe Asp Lys Ser Gln Val Pro
930 935 940
Thr Ile Asp Gln Asp Tyr Ala Ser Ala Phe Glu Pro Met Asn Glu Trp
945 950 955 960
Glu Arg Asn Leu Ala Glu Lys Glu Asp Asn Val Lys Ser Tyr Met Asp
965 970 975
Met Gln Arg Arg Ala Ser Pro Asp Leu Ser Thr Gly Tyr Trp Lys Leu
980 985 990
Ser Pro Lys Gln Tyr Lys Ile Pro Cys Leu Glu Val Asp Val Asn Asp
995 1000 1005

Ile Asp Val Val Gly Gln Asp Met Leu Glu Ile Leu Met Thr Val Phe
1010 1015 1020
Ser Ala Ser Gln Arg Ile Glu Leu His Leu Asn His Ser Arg Gly Phe
1025 1030 1035 1040
Ile Glu Ser Ile Arg Pro Ala Leu Glu Leu Ser Lys Ala Ser Val Thr
1045 1050 1055
Lys Cys Ser Ile Ser Lys Leu Glu Leu Ser Ala Ala Glu Gln Glu Leu
1060 1065 1070
Leu Leu Thr Leu Pro Ser Leu Glu Ser Leu Glu Val Ser Gly Thr Ile
1075 1080 1085
Gln Ser Gln Asp Gln Ile Phe Pro Asn Leu Asp Lys Phe Leu Cys Leu
1090 1095 1100
Lys Glu Leu Ser Val Asp Leu Glu Gly Asn Ile Asn Val Phe Ser Val
1105 1110 1115 1120
Ile Pro Glu Glu Phe Pro Asn Phe His His Met Glu Lys Leu Leu Ile
1125 1130 1135
Gln Ile Ser Ala Glu Tyr Asp Pro Ser Lys Leu Val Lys Leu Ile Gln
1140 1145 1150
Asn Ser Pro Asn Leu His Val Phe His Leu Lys Cys Asn Phe Phe Ser
1155 1160 1165
Asp Phe Gly Ser Leu Met Thr Met Leu Val Ser Cys Lys Lys Leu Thr
1170 1175 1180
Glu Ile Lys Phe Ser Asp Ser Phe Phe Gln Ala Val Pro Phe Val Ala
1185 1190 1195 1200
Ser Leu Pro Asn Phe Ile Ser Leu Lys Ile Leu Asn Leu Glu Gly Gln
1205 1210 1215
Gln Phe Pro Asp Glu Glu Thr Ser Glu Lys Phe Ala Tyr Ile Leu Gly
1220 1225 1230

Ser Leu Ser Asn Leu Glu Glu Leu Ile Leu Pro Thr Gly Asp Gly Ile
1235 1240 1245

Tyr Arg Val Ala Lys Leu Ile Ile Gln Gln Cys Gln Gln Leu His Cys
1250 1255 1260

Leu Arg Val Leu Ser Phe Phe Lys Thr Leu Asn Asp Asp Ser Val Val
1265 1270 1275 1280

Glu Ile Ala Lys Val Ala Ile Ser Gly Gly Phe Gln Lys Leu Glu Asn
1285 1290 1295

Leu Lys Leu Ser Ile Asn His Lys Ile Thr Glu Glu Gly Tyr Arg Asn
1300 1305 1310

Phe Phe Gln Ala Leu Asp Asn Met Pro Asn Leu Gln Glu Leu Asp Ile
1315 1320 1325

Ser Arg His Phe Thr Glu Cys Ile Lys Ala Gln Ala Thr Thr Val Lys
1330 1335 1340

Ser Leu Ser Gln Cys Val Leu Arg Leu Pro Arg Leu Ile Arg Leu Asn
1345 1350 1355 1360

Met Leu Ser Trp Leu Leu Asp Ala Asp Asp Ile Ala Leu Leu Asn Val
1365 1370 1375

Met Lys Glu Arg His Pro Gln Ser Lys Tyr Leu Thr Ile Leu Gln Lys
1380 1385 1390

Trp Ile Leu Pro Phe Ser Pro Ile Ile Gln Lys
1395 1400 1403

<210> 2

<211> 5984

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (292).. (4500)

<400> 2

ACAAAAGGTC CTGTGCTCAC CTGGGACCCCT TCTGGACGTT GCCCTGTGTT CCTCTTCGCC 60
TGCCGTGTTCA TCTACGACGA ACCCCGGGTA TTGACCCAG ACAACAATGC CACTTCATAT 120
TGGGGACTTC GTCTGGGATT CCAAGGTGCA TTCATTGCAA AGTTCCTTAA ATATTTTCTC 180
ACTGCTTCCT ACTAAAGGAC GGACAGAGCA TTTGTTCTTC AGCCAGATAC TTTCTTCCA 240
CTGGCCAGCA TTCTCCTCTA TTAGACTAGA ACTGTGGATA AACCTCAGAA AATGGCCACC 300
CAGCAGAAAAG CCTCTGACGA GAGGATCTCC CAGTTTGATC ACAATTTGCT GCCAGAGCTG 360
TCTGCTCTTC TGGGCCTAGA TGCAGTTCAG TTGGCAAAGG AACTAGAAGA AGAGGAGCAG 420
AAGGAGCGAG CAAAAATGCA GAAAGGCTAC AACTCTCAA TGGCAGTGA AGCAAAAAGG 480
TTAAAGACTT TTGTGACTTA TGAGCCGTAC AGCTCATGGA TACCACAGGA GATGGCGGCC 540
GCTGGGTTTT ACTTCACTGG GGTAAAATCT GGGATTGAGT GCTTCTGCTG TAGCCTAATC 600
CTCTTTGGTG CCGGCCTCAC GAGACTCCCC ATAGAAGACC ACAAGAGGTT TCATCCAGAT 660
TGTGGGTTCC TTTTGAACAA GGATGTTGGT AACATTGCCA AGTACGACAT AAGGGTGAAG 720
AATCTGAAGA GCAGGCTGAG AGGAGGTAAA ATGAGGTACC AAGAAGAGGA GGCTAGACTT 780
GCATCCTTCA GGAAGTGGCC ATTTTATGTC CAAGGGATAT CCCCTTGTGT GCTCTCAGAG 840
GCTGGCTTTG TCTTTACAGG TAAACAGGAC ACGGTACAGT GTTTTCTCTG TGGTGGATGT 900
TTAGGAAATT GGAAGAAGG AGATGATCCT TGGAAGGAAC ATGCCAAATG GTTCCCCAAA 960
TGTGAATTTT TTCGGAGTAA GAAATCCTCA GAGGAAATTA CCCAGTATAT TCAAAGCTAC 1020
AAGGGATTTG TTGACATAAC GGGAGAACAT TTTGTGAATT CCTGGGTCCA GAGAGAATTA 1080
CCTATGGCAT CAGCTTATTG CAATGACAGC ATCTTTGCTT ACGAAGAACT ACGGCTGGAC 1140
TCTTTTAAGG ACTGGCCCCG GGAATCAGCT GTGGGAGTTG CAGCACTGGC CAAAGCAGGT 1200
CTTTTCTACA CAGGTATAAA GGACATCGTC CAGTGCTTTT CCTGTGGAGG GTGTTTAGAG 1260
AAATGGCAGG AAGGTGATGA CCCATTAGAC GATCACACCA GATGTTTTCC CAATTGTCCA 1320
TTTCTCCAAA ATATGAAGTC CTCTGCGGAA GTGACTCCAG ACCTTCAGAG CCGTGGTGAA 1380
CTTTGTGAAT TACTGGAAAC CACAAGTGAA AGCAATCTTG AAGATTCAAT AGCAGTTGGT 1440
CCTATAGTGC CAGAAATGGC ACAGGGTGAA GCCCAGTGGT TTCAAGAGGC AAAGAATCTG 1500

AATGAGCAGC TGAGAGCAGC TTATACCAGC GCCAGTTTCC GCCACATGTC TTTGCTTGAT 1560
ATCTCTTCCG ATCTGGCCAC GGACCACTTG CTGGGCTGTG ATCTGTCTAT TGCTTCAAAA 1620
CACATCAGCA AACCTGTGCA AGAACCTCTG GTGCTGCCTG AGGTCTTTGG CAACTTGAAC 1680
TCTGTCATGT GTGTGGAGGG TGAAGCTGGA AGTGGAAAGA CGGTCTCCTT GAAGAAAATA 1740
GCTTTTCTGT GGGCATCTGG ATGCTGTCCC CTGTTAAACA GGTTCAGCT GGTTTTCTAC 1800
CTCTCCCTTA GTTCCACCAG ACCAGACGAG GGGCTGGCCA GTATCATCTG TGACCAGCTC 1860
CTAGAGAAAG AAGGATCTGT TACTGAAATG TGCATGAGGA ACATTATCCA GCAGTTAAAG 1920
AATCAGGTCT TATTCCTTTT AGATGACTAC AAAGAAATAT GTTCAATCCC TCAAGTCATA 1980
GGAAAACTGA TTCAAAAAA CCACTTATCC CGGACCTGCC TATTGATTGC TGTCCGTACA 2040
AACAGGGCCA GGGACATCCG CCGATACCTA GAGACCATTC TAGAGATCAA AGCATTTCCC 2100
TTTTATAATA CTGTCTGTAT ATTACGGAAG CTCTTTTCAC ATAATATGAC TCGTCTGCGA 2160
AAGTTTATGG TTTACTTTGG AAAGAACCAA AGTTTGCAGA AGATACAGAA AACTCCTCTC 2220
TTTGTGGCGG CGATCTGTGC TCATTGGTTT CAGTATCCTT TTGACCCATC CTTTGATGAT 2280
GTGGCTGTTT TCAAGTCCTA TATGGAACGC CTTTCCTTAA GGAACAAAGC GACAGCTGAA 2340
ATTCTCAAAG CAACTGTGTC CTCCTGTGGT GAGCTGGCCT TGAAAGGGTT TTTTTCATGT 2400
TGCTTTGAGT TTAATGATGA TGATCTCGCA GAAGCAGGGG TTGATGAAGA TGAAGATCTA 2460
ACCATGTGCT TGATGAGCAA ATTTACAGCC CAGAGACTAA GACCATTCTA CCGGTTTTTA 2520
AGTCCTGCCT TCCAAGAATT TCTTGCGGGG ATGAGGCTGA TTGAACTCCT GGATTCAGAT 2580
AGGCAGGAAC ATCAAGATTT GGGACTGTAT CATTTGAAAC AAATCAACTC ACCCATGATG 2640
ACTGTAAGCG CCTACAACAA TTTTTGAAC TATGTCTCCA GCCTCCCTTC AACAAAAGCA 2700
GGGCCCAAAA TTGTGTCTCA TTTGCTCCAT TTAGTGGATA ACAAAGAGTC ATTGAGAAT 2760
ATATCTGAAA ATGATGACTA CTAAAGCAC CAGCCAGAAA TTCACTGCA GATGCAGTTA 2820
CTTAGGGGAT TGTGGCAAAT TTGTCCACAA GCTTACTTTT CAATGGTTTC AGAACATTTA 2880
CTGGTTCTTG CCCTGAAAAC TGCTTATCAA AGCAACACTG TTGCTGCGTG TTCTCCATTT 2940
GTTTTGCAAT TCCTTCAAGG GAGAACACTG ACTTTGGGTG CGCTTAACTT ACAGTACTTT 3000
TTGACCACC CAGAAAGCTT GTCATTGTTG AGGAGCATCC ACTTCCAAT ACGAGGAAAT 3060
AAGACATCAC CCAGAGCACA TTTTTCAGTT CTGGAAACAT GTTTGGACAA ATCACAGGTG 3120
CCAACATAG ATCAGGACTA TGCTTCTGCC TTTGAACCTA TGAATGAATG GGAGCGAAAT 3180

TTAGCTGAAA AAGAGGATAA TGTAAGAGC TATATGGATA TGCAGCGCAG GGCATCACCA 3240
GACCTTAGTA CTGGCTATTG GAAACTTTCT CCAAAGCAGT ACAAGATTCC CTGTCTAGAA 3300
GTGGATGTGA ATGATATTGA TGTGTAGGC CAGGATATGC TTGAGATTCT AATGACAGTT 3360
TTCTCAGCTT CACAGCGCAT CGAACTCCAT TTAACCACA GCAGAGGCTT TATAGAAAGC 3420
ATCGGCCAG CTCTTGAGCT GTCTAAGGCC TCTGTCACCA AGTGCTCCAT AAGCAAGTTG 3480
GAACTCAGCG CAGCCGAACA GGAAGTCTT CTCACCTGC CTTCCCTGGA ATCTCTTGAA 3540
GTCTCAGGGA CAATCCAGTC ACAAGACCA ATCTTTCCTA ATCTGGATAA GTTCCTGTGC 3600
CTGAAAGAAC TGTCTGTGGA TCTGGAGGGC AATATAAATG TTTTTCAGT CATTCTTGAA 3660
GAATTTCCAA ACTTCACCA TATGGAGAAA TTATTGATCC AAATTCAGC TGAGTATGAT 3720
CCTTCCAAAC TAGTAAAT AATTCAAAT TCTCCAAACC TTCATGTTT CCATCTGAAG 3780
TGTAATTCT TTTGGATT TGGGTCTCTC ATGACTATGC TTGTTTCTG TAAGAACTC 3840
ACAGAAATTA AGTTTTCGGA TTCATTTTT CAAGCCGTCC CATTTGTTGC CAGTTGCCA 3900
AATTTATTT CTCTGAAGAT ATTAATCTT GAAGGCCAGC AATTCCTGA TGAGGAAACA 3960
TCAGAAAAAT TTGCCTACAT TTTAGGTTCT CTTAGTAACC TGAAGAATT GATCCTTCCT 4020
ACTGGGGATG GAATTTATCG AGTGGCCAAA CTGATCATCC AGCAGTGTC GCAGCTTCAT 4080
TGTCTCGAG TCCTCTCATT TTTCAAGACT TTGAATGATG ACAGCGTGGT GGAAATTGCC 4140
AAAGTAGCAA TCAGTGGAGG TTTCCAGAAA CTTGAGAACC TAAAGCTTTC AATCAATCAC 4200
AAGATTACAG AGGAAGGATA CAGAAATTT TTTCAAGCAC TGGACAACAT GCCAACTTG 4260
CAGGAGTTGG ACATCTCCAG GCATTCACA GAGTGTATCA AAGCTCAGGC CACAACAGTC 4320
AAGTCTTTGA GTCAATGTGT GTTACGACTA CCAAGGCTCA TTAGACTGAA CATGTTAAGT 4380
TGGCTCTTGG ATGCAGATGA TATTGCATTG CTTAATGTCA TGAAAGAAAG ACATCCTCAA 4440
TCTAAGTACT TAACTATTCT CCAGAAATGG ATACTGCCGT TCTCTCCAAT CATTGAGAAA 4500
TAAAGATTG AGCTAAAAAC TGCTGAATCA ATAATTTGTC TTGGGGCATA TTGAGGATGT 4560
AAAAAAGTT GTTGATTAAT GCTAAAAACC AAATTATCCA AAATTATTTT ATTAAATATT 4620
GCATACAAAA GAAAATGTGT AAGGCTTGCT AAAAAACAAA AAAAAACAAA ACACAGTCCT 4680
GCATACTCAC CACCAAGCTC AAGAAATAA TCATCAACCA TACCTTTGAG GTCCCTGAGT 4740
AATCCACCCC AGCTAAAGGC AAACCCTTCA ATCAAGTTA TACAGCAAAC CCTCCATTGT 4800
CCATGGTCAA CAGGGAAGGG GTTGGGGACA GGTCTGCCAA TCTATCTAAA AGCCACAATA 4860

TGGAAGAAGT ATTCAATTTA TATAATAAAT GGCTAACTTA ACGGTTGAAT CACTTTTCATA 4920
CATGGATGAA ACGGGTTTAA CACAGGATCC ACATGAATCT TCTGTGGGCC AAAATATGTT 4980
CCTTAATCCT TGTAGAACCT GTCTTCTATA TTGAACTAGC TTTGGTACAG TAGAGTTAAC 5040
TTACTTTCCA TTTATCCACT GCCAATATAA AGAGGAAACA GGGGTTAGGG AAAAATGACT 5100
TCATTCCAGA GGCTTCTCAG AGTTCAACAT ATGCTATAAT TTAGAATTTT CTTATGAATC 5160
CACTCTACTT GGGTAGAAAA TATTTTATCT CTAGTGATTG CATATTATTT CCATATCATA 5220
GTATTTTCATA GTATTATATT TGATATGAGT GTCTATATCA ATGTCAGTGT CCAGAATTTT 5280
GTTCTACCA GTTGAGTAGT TTTCTGAACG GCCAGAAGAC CATTCGAAAT TCATGATACT 5340
ACTATAAGTT GGTAACAAC CATACTTTTA TCCTCATTTT TATTCTCACT AAGAAAAAAG 5400
TCAACTCCCC TCCCCTTGCC CAAGTATGAA ATATAGGGAC AGTATGTATG GTGTGGTCTC 5460
ATTTGTTTAG AAAACCACTT ATGACTGGGT GCGGTGGCTC ACACCTGTAA TCCGAGCACT 5520
TTGGGAGGCT GAGGCGGGCG AATCATTTGA GGTGAGGAGT TCGAGACCGG CCTGGCCAGC 5580
ATGGTGAAAC CCCATTTTTG CTAAAGGTAG AAAAATTAGC CAGGTGTGGT GGCACATGCC 5640
TGTGGTCCCA GCCACTGGGG CGGCTGAGAC GCAGGACTTG CTTGAAACCG GGAGGCAGAG 5700
GTTGCAGTGA GCCGAGATGG CGCCACTGCA TTCCAGCCTG GGCAACAGAG CAAGACCCTG 5760
TCTGTTTCAA AACAAAAAAC AAAACCACTT ATATTGCTAG CTACATTAAG AATTTCTGAA 5820
TATGTTACTG AGCTTGCTTG TGGTAACCAT TTATAATATC AGAAAGTATA TGTACACCAA 5880
AACATGTTGA ACATCCATGT TGTACAACTG AAATATAAAT AATTTTGTCA ATTATACCTA 5940
AATAAACTG GAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA 5984

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05841

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C12P 21/08, C07K 16/18,
G01N 33/577, G01N 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C12P 21/08, C07K 16/18,
G01N 33/577, G01N 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 97/26331, A (University of Ottawa), 24 July, 1997 (24.07.97) & JP, 11-503620, A	1-19
A	Biological Abstracts, No. 199799598887, Xu D G et al, "Distribution of neuronal apoptosis inhibitory protein-like immunoreactivity in the rat central nervous System", & Journal of Comparative Neurology (1997), Vol. 382, No. 2, pages 247-259	1-19
A	Natalle Roy et al, "The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy", Cell (1995), Vol. 80, No. 1, pages 167-178	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 December, 1999 (22.12.99)

Date of mailing of the international search report
28 December, 1999 (28.12.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C12N 15/12, C12P 21/08, C07K 16/18, G01N 33/577, G01N 33/53		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C12N 15/12, C12P 21/08, C07K 16/18, G01N 33/577, G01N 33/53		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 97/26331, A (ユニバーシティ オブ オタワ) 24.7月.1997 (24.07.97) & JP, 11-503620, A	1-19
A	Biological Abstracts, No.199799598887, Xu D G et al, "Distribution of neuronal apoptosis inhibitory protein-like immunoreactivity in the rat central nervous system", & Journal of Comparative Neurology (1997), Vol. 382, No. 2, p. 247-259	1-19
A	Natalle Roy et al, "The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy", Cell (1995), Vol. 80, No. 1, p. 167-178	1-19
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 22.12.99	国際調査報告の発送日 28.12.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 印	4 N 9162
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		